



**IBMC**  
**UPR 9002**  
**UPR 9021**  
**UPR 9022**



**IBMP**  
**UPR 2357**



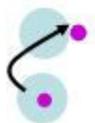
**Institut de  
Botanique**  
**GMGM**  
**UMR7156**



**IPCB**  
**GMGM**  
**UMR 7156**

## Plateforme protéomique de l'Esplanade, guide utilisateur 2010

- fonctionnement des plateaux techniques électrophorèse
- prestations spectrométrie de masse

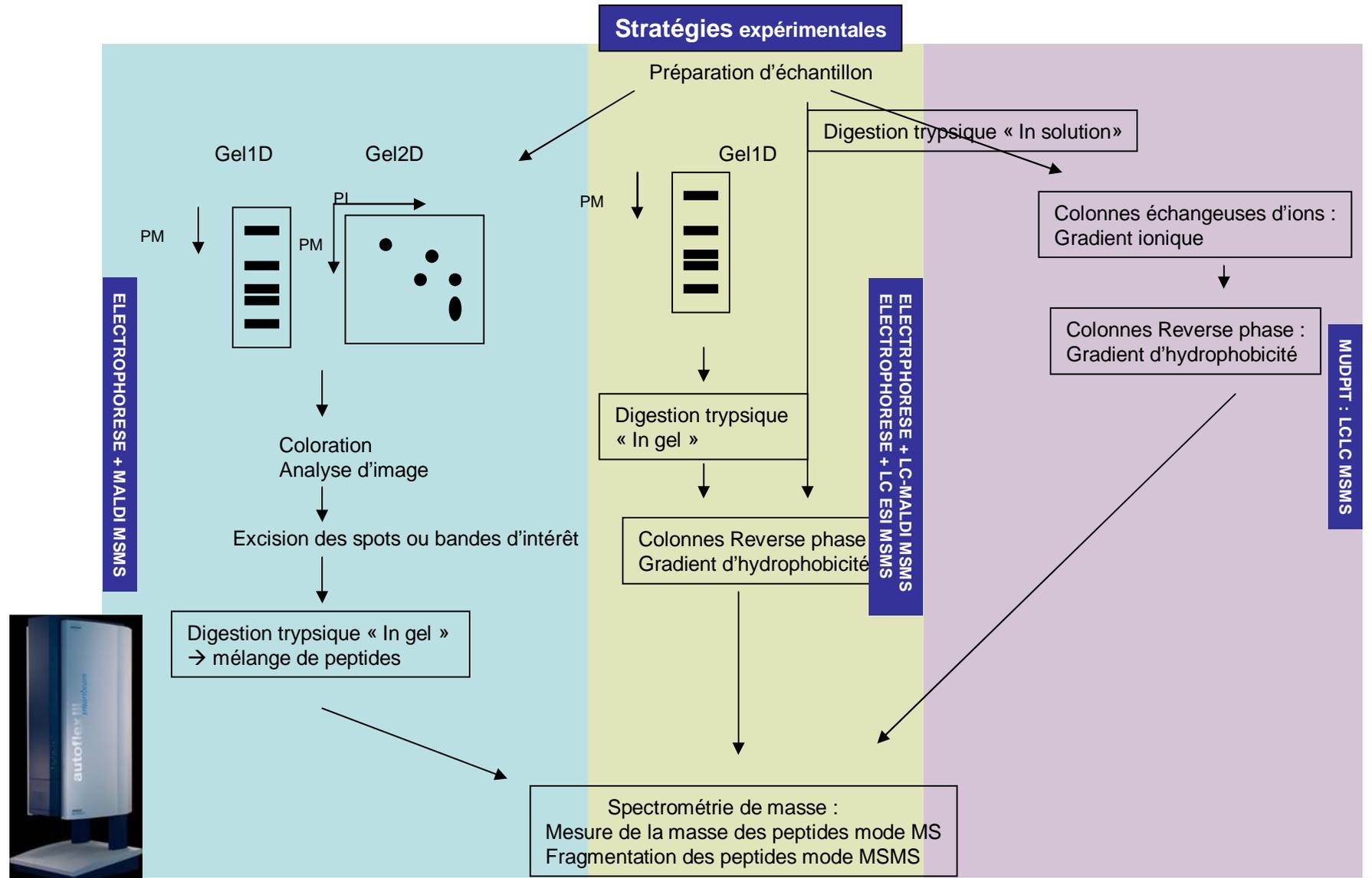


Plateforme Protéomique  
de l'Esplanade

IBMC  
IBMP  
GMGM



# Analyses protéomique « bottom up » (analyse de peptides par spectrométrie de masse après clivage enzymatique)



**Identification des protéines**

interrogation des banques de données protéiques : digestion théorique de toutes les protéines présentes dans la banque.

Masses expérimentales des peptides / Masses théoriques prédites

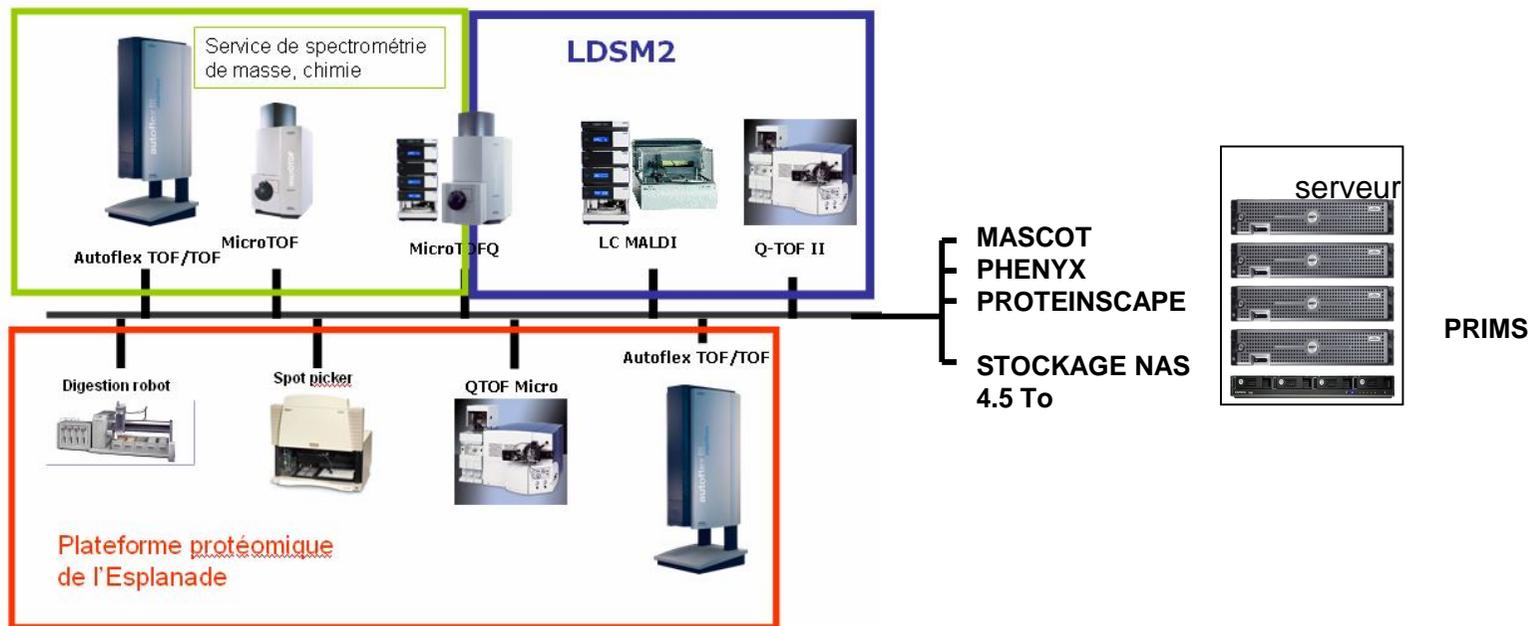
Masses expérimentales des fragments des peptides / Masses théoriques des fragments des peptides

**PMF : peptide mass fingerprinting**

**PFF : peptide fragment fingerprinting**

**→Si Match : identification**

**Outils de spectrométrie de masse présents sur le campus de l'Esplanade**



**Analyses protéomiques « Bottom-up »**

Electrophorèse + MALDI MSMS	→	Disponible sur la plateforme
Electrophorèse + LC MALDI MSMS	→	En développement : collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse LDSM2 (E.Leize)
Electrophorèse + LC ESI MSMS	→	LDSM2 uniquement
MUDPIT : LCLC MSMS	→	Non disponible

**Analyses protéomiques « Top down » : mesure de masse de protéines intactes**

Injection phase liquide electrospray MS  
ESI Q TOF



# Electrophorèse

IBMC

IBMP

GMGM

systèmes IEF



Systèmes SDS PAGE



Gel1D, Gel2D 17cm2  
Gel2D 7cm2



Gel1D, Gel2D 17cm2  
Gel2D 7cm2  
Gel2D 24 x 20cm



Scanner

Visible  
Gels coomassie  
Silver staining



Fluorescent  
Marquage DIGE, cy2, cy3, cy5  
Sypro ruby, proQ diamond



DIGE imager



Typhoon DIGE

Logiciel d'analyse d'image



PDquest 8.0



Image master 6.



Image master 6.

Robot spot cutter

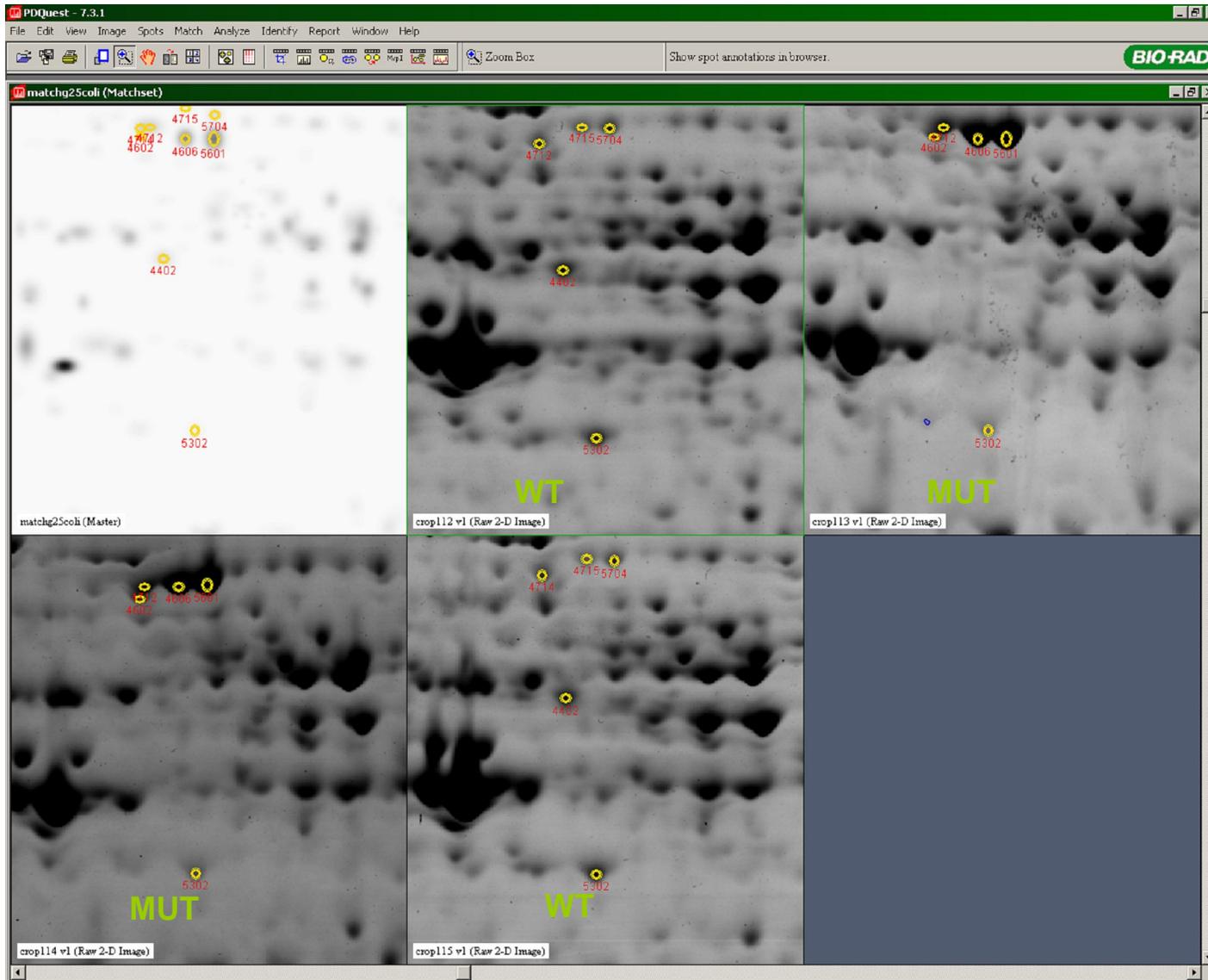


→ Expertise électrophorèse

**Protéomique quantitative :**

Analyses différentielles de l'expression protéique à partir de gels 2D,  
2D « classique » : bleu colloïdal.

WT  
VS  
Mutant





**Expertise électrophorèse**

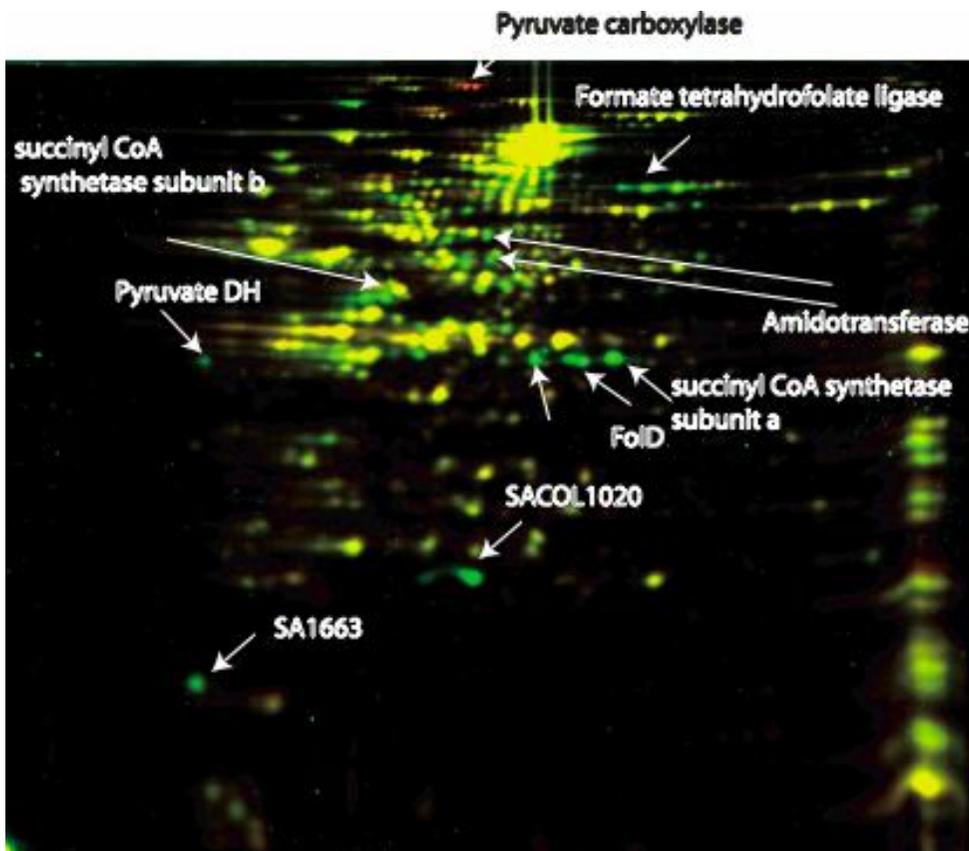
**Protéomique quantitative :**

Analyses différentielles de l'expression protéique à partir de gels 2D

2D DIGE (differential in gel electrophoresis) : marquage des lysines avec Cy3, Cy5, Cy2

—————> Co-électrophorèse

**Effect of a non coding RNA from *Staphylococcus aureus* on protein synthesis**



- **Red spot:** Proteins expressed only in the wild type strain (RsaX15a+)
- **Green spot:** Proteins expressed only in the mutant strain (RsaX15a-)
- **Yellow spot:** Proteins unchanged in the wild type and mutant strains

Data from P.Fechter 9002



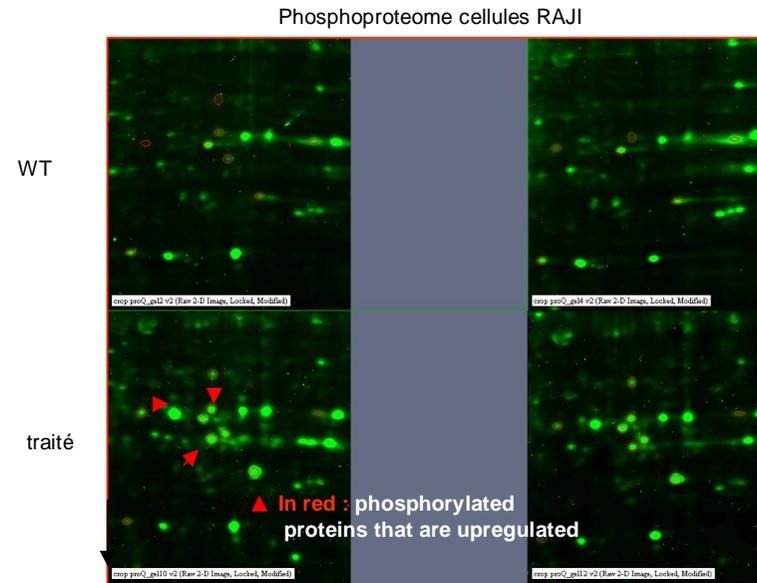
## Expertise électrophorèse

### Protéomique fonctionnelle :

Etude de PTM, en particulier les phosphoprotéines.

→ Détection des phosphoprotéines  
par colorant fluorescent (proQ diamond)

Data from  
J.Beyrath 9021



### Etude de protéines isolées par gel 2D,1D,

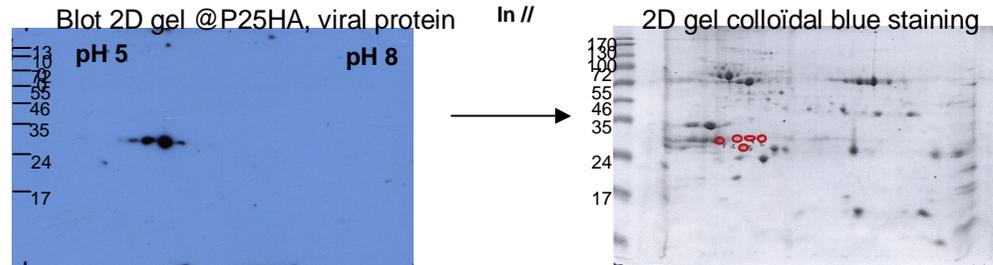
immuno-détection, avec ou sans traitement phosphatase.

Spinach nuclei isolation :

Seaking of viral protein  
P25 from BNYVV virus

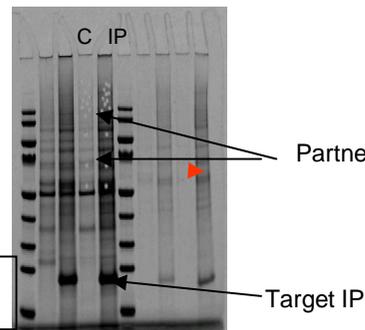
Is it phosphorylated ?

Data from  
A.Schirmer IBMP



### Etudes de complexes protéiques

→ Expériences d'immuno-affinité,  
Gels bleu natif



Data from  
S.Wadworth IBMP

Vers la spectrométrie de masse

## Fonctionnement mutualisé des plateaux d'électrophorèse

IBMC sous-sol

responsable :P.Hammann

### Accessible sur réservation

#### Avantages :

- Environnement dédié : limite les contaminations en kératine
- Support technique des ingénieurs
- Consommables protéomiques sur place (dans la limite des stocks)
- Systèmes prêts à l'emploi
- Banque de protocoles

#### Conditions d'utilisation :

- Formation préalable
- Réservation de l'appareillage et des consommables
- Nettoyez après utilisation
- Facturation des prestations au prix coûtant.



Plateau identique à l'IBMP 3ème étage

responsable :N.Baumberger

## Formation électrophorèse

CNRS : 2004-2005-2006-2007



Depuis 2007

**En immersion : 3-5 jours**

Formations en immersion sur projet, 1 à 2 participants max

- Travail sur vos échantillons
- extraction
- séparation
- analyse d'image

Utilisateurs référencés

N.Page	9021
J.Beyrath	9021
A.Ayyaz	9022
H.Harashima	IBMP
M.Shchepetilnikov	IBMP
JL.Evrard	IBMP
M.Bureau	IBMP
F.Lotfi	IBMP
P.Fechter	9002
M.Frechin	9002
F.Ploetze	GMGM
B.Rinaldi	GMGM

**But : autonomie**

Sans collaboration (aide ponctuelle des ingénieurs)

Devenir un expert...



# Spectrométrie de masse



# Analyses de spectrométrie de masse



## Analyses MALDI TOF TOF

## Analyses ESI Q TOF

**Haut débit**

Identification de spots protéiques 2D ou bandes 1D par **Peptide Mass Fingerprinting** et (ou) **Peptide Fragment Fingerprinting**

Validation selon critères Mascot

Résultats

Enzyme Trypsine

**Bas débit**

- Recherches de modifications post traductionnelles
- Site de clivage
- Analyses de complexes, recherche de partenaires présents en faible quantité.

Mesure de masse entière

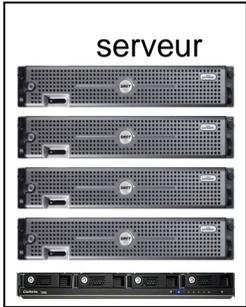
Protéines entières en conditions dénaturantes

Contrôle qualité de protéines recombinantes

Stratégie de recouvrement optimal de séquence : Digestion théorique appliquée au spectre expérimental

Enzyme trypsine  
AspN  
GluC  
LysC  
ArgC

**Serveur protéomique :**  
Automatisation de l'acquisition  
Sauvegarde des données  
LIMS



- Phenyx
- Proteinscape
- Prims
- mascot
- NAS 4.5To

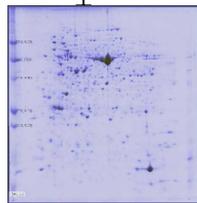
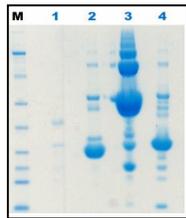
Résultats

# Analyses haut débit, in gel digest : en pratique

## 1. Electrophorèse

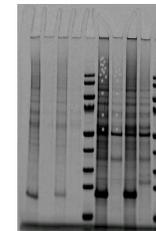
### Dans votre laboratoire

Travaillez si possible avec du matériel dédié (plaques et boîte de coloration)  
Colorez avec des solutions compatibles masse  
Bleu G250 > bleu R250  
Silver mass compatible  
Sypro ruby  
Épaisseur : entre 0.75 et 1mm



### Service de protéomique

Echantillons précieux : IP,  
Utilisez les gels précoulés  
gel gradient 4-12% invitrogen  
disponibles sur réservation  
Épaisseur 1mm



## 2. Découpage

### Manuel

Découpez au plus près de la bande  
Conditionnement dans tube eppendorf (stock -20°C)

### Automatique

(non facturé pour les partenaires)  
1.5 mm de diamètre  
Conditionnement en microplaques 96



Robot  
exquest  
Biorad

Microplaque d'échantillon 96  
Plaque N°2010\_6  
+  
Remplir le formulaire excel d'analyse 2010

Paramètres de « Traçabilité d'échantillons » :  
-stockage de résultats  
-Par année de réalisation  
-Par microplaque 96 : position dans la plaque n° 2010\_x  
-Par fichier excel « analyses MALDI »



**Keratine contamination**

# Formulaire d'analyse 2010

Microsoft Excel - analyses G.B151010.xls

Échier Edition Affichage Insertion Format Outils Données Fenêtre ?

Snagit Fenêtre

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	<b>Demande d'analyse MALDI, in gel digest</b>																
2																	
3	Date :	15012010															
4																	
5	Nom	Bonnard															
6	Prénom	Geraldine															
7																	
8	Equipe	Bonnard															
9																	
10	Unité	IBMP															
11																	
12	<b>Echantillons</b>																
13	Nom	Précisez dans le tableau MS le nom des échantillons et MW/PI expérimentaux															
14																	
15		Photo du gel															
16	Format de l'échantillon																
17		<input checked="" type="checkbox"/> gel 1D SDS PAGE															
18		<input type="checkbox"/> gel 2D															
19		<input type="checkbox"/> gel 1D natif															
20		<input type="checkbox"/> autre															
21																	
22	Methode de coloration																
23		<input type="checkbox"/> bleu colloidal															
24		<input checked="" type="checkbox"/> bleu R250															
25		<input type="checkbox"/> argent															
26		<input type="checkbox"/> sypro ruby															
27		<input type="checkbox"/> autre															
28																	
29	<b>Type d'analyse</b> (voir descriptif dans l'onglet facturation)																
30																	
31	"haut débit"	<input checked="" type="checkbox"/> Identification à partir de bande 1D et 2D trypsine															
32		<input checked="" type="checkbox"/> Contrôle de protéine recombinante Trypsine															
33		<input type="checkbox"/> Contrôle de protéine recombinante autre enzyme															
34		(collez la séquence + tag dans l'onglet Theoretical digest) (prédiction de coupure avec le logiciel peptidmass : )															
35		<input type="checkbox"/> AspN															
36		<input type="checkbox"/> GluC															
37		<input type="checkbox"/> LysC															
38																	
39	"bas débit"	<input type="checkbox"/> Recherche de site de clivage															
40		<input type="checkbox"/> PTM															
41		<input type="checkbox"/> autre															
42		Copiez toute information utile pour défricher l'analyse															
43		Etude de faisabilité préalable + échantillons visibles bleu indispensable.															
44																	
45	<b>Identification :</b>																
46	Séquencé	<input checked="" type="checkbox"/> Précisez : Human, Drosophila, Arabidopsis, etc...															
47		Arabidopsis															
48	Non séquencé	<input type="checkbox"/> organisme proche connu															
49																	
50																	

Prêt

NUM

SequenceEditor - Seq... Microsoft Excel - anal... \\Bureau\analyses

9:07 AM

A compléter et à envoyer par mail au service

Onglet MS : remplir les noms d'échantillons

Onglet Theoretical digest :  
Coller votre séquence + tag

→ Résultats par mail → Délai d'attente : 1-2 semaines

**Tableau de résultats**

RESULTATS MALDI												
Nom Echantillon	Experimental Mw/PI	Mibt	PMF	PFF	NB DE PEPTIDES MSMS	Identification	Theoretical Mw/pi	N°Access	C	Score Mascot	Erreur (ppm)	% recouvr.
FC1-1			x	x	3	FC1(FERROCHELATASE 1); ferrochelataze [Arabidopsis thaliana]	52228/5.6	30690097		305	11	20
FC2			x	x	4	FC2 (FERROCHELATASE 2); ferrochelataze [Arabidopsis thaliana]	56811/5.21	15227742		568	18	40
FC2degrad ?			x	x	2	ferrochelataze [Arabidopsis thaliana]	56793/5.34	2623990		294	11	15
FC1-2			x	x	3	50s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome	20144/9.49	116667438		230	22	64
FC1-2			x	x	3	Structure-Function In E. Coli Iron Superoxide Dismutase	21179/5.58	648114		234	21	51
ContFC1-2			x	x	3	Elongation Factor From E.Coli	43296/5.3	11514297		389	10	43
ContFC1-2			x	x	5	Ef-Tu-Mggdp	43296/5.3	11514297		486	10	43
Nombre d'analyses :							Nombre d'identifications					
A remplir par l'utilisateur												

Validation des résultats selon critères mascot

Impressions ou pdf des pages mascot

**Code de validation du service**

- Identification : Qualité publication
- Identification probable, non qualité publication

**Mascot Search Results**

**Protein Mascot Search Results**

Match :  
 FC1 (f. Found) **Protein View**

Match to: [gi|30690097](#) Score: 344 Expect: 3.9e-028  
 FC1 (ferrochelataze 1); ferrochelataze [Arabidopsis thaliana]  
 NCBI B: Found in search of DATA.TXT  
 Uniform

Nomina: Nominal mass (M<sub>0</sub>): 52228; Calculated pI value: 5.60  
 Links: NCBI BLAST search of [gi|30690097](#) against nr  
[gi|1793](#): Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications  
[gi|117](#)  
[gi|510](#) Taxonomy: [Arabidopsis thaliana](#)  
[gi|511](#) Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[gi|259](#); [gi|79328715](#) from [Arabidopsis thaliana](#)  
[gi|110](#); [gi|1170237](#) from [Arabidopsis thaliana](#)  
[gi|5107825](#) from [Arabidopsis thaliana](#)  
 Fixed: [gi|511081](#) from [Arabidopsis thaliana](#)  
 Variab: [gi|2597828](#) from [Arabidopsis thaliana](#)  
 Cleava: [gi|110741028](#) from [Arabidopsis thaliana](#)

Sequen: Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Matche: Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 1 Sequence Coverage: 26%

51  
 101 Matched peptides shown in **Bold Red**

151  
 201 1 MQATALSSGF NPLTKRKDHR FPRSCSQRNS LSLIQCDIKE RSFGESMITT  
 251 51 NRGLSFETNV FEQARSVTGD CSYDETSAAK RSHVVAEDKI GVLLLNLGGP  
 301 101 ETLNDVQPFLL YNLFADPDII RLPKPFQFLQ GTIAKFSIVV RPKSKEGYA  
 351 151 AIGGGSPLRK ITDEQADAIAK HSLQAKNIAA HNYVGRHYVY PFTTEAVQQI  
 401 201 KRDRITRLVV LPLYPQYSIS TTGSSIRVLQ DLFKDPYLA GVPVAIKSW  
 451 251 YQRRGYVNSM ADLIERELQT FSDPKVEVIF FSAHGVPVSY VENAGDPYOK  
 301 QHEECIDLIN EELKARGVLM DHKLAYQSRV GPVQWLKPTT DEVLVDLGRS  
 351 GVRSLAVPV SFVSEHIEL EELDMYREL ALKSGVENWG RVPALGLTPS  
 401 FTITLADAVY ESLPSAEANS NPNVAVDSED SESSDAFSYI VKHFFQSILA  
 451 FVLLSPKMF HAFRNL

S

Show predicted peptides also

Facturation : → Délais d'attente : 4 mois

## Facturation

PRESTATIONS	IBMC, IBMP, UMR7156	Extérieurs publics	Code prestations	Quantité	Total
Analyse MALDI haut débit _1-16 echantillons	20.00	25.00	A		
Analyse MALDI haut débit _17-32 echantillons	15.00	20.00	A1		
Analyse MALDI haut débit _>32 echantillons	10.00	15.00	A2		
Contrôle qualité Trypsine	25.00	50.00	B1		
Contrôle qualité autre enzyme	50.00	60.00	B2		
Analyse ESI Q TOF, conditions dénaturantes	50.00	60.00	E		
Decoupage automatisé des spots	non facture	1E le spot	D		
Equipement IEF (session 1-2 jours) 7cm	10.00 €		I1		
Equipement IEF (session 1-2 jours) 17cm	15.00 €		I2		
Equipement Electrophorèse grand gel (17 cm) (session 1-2 j)	10.00 €		I3		
Gels SDS PAGE 4-12 % tampon MES 8cm	20.00 €		G1		
Coloration bleu colloïdal 7cm	5.00 €		C1		
Coloration bleu colloïdal 17cm	10.00 €		C2		
Coloration Argent 7cm	5.00 €		C3		
Coloration Argent 17cm	10.00 €		C4		
Reactif DIGE : 400 pmol Cy3, Cy5, Cy2	75.00 €				
Reactif proQ diamond : 100 ml	40.00 €				

Onglet facturation du fichier analyses MALDI 2010



Seuils de sensibilité : électrophorèse-MALDI (in gel digest)

